

REMARKS

Claims 1-16 are in this case and no amendments have been made to them.

The title of the application has been amended to better reflect the subject matter of the application. Please note that the term “glycated protein” is found throughout the specification and claims so that it is submitted that no new matter is believed to have been added.

The specification of the application has been amended at page 22, paragraph [0042] to replace Table 2 which had been erroneously entered. Please note that in the originally filed application, Table 2 and Table 3 (on page 24) are identical. The insertion of Table 3 in place of the actual Table 2 at page 22 of the specification is an inadvertent error. Please note that the Table 2 of the originally filed application refers to Example 3, not Example 2 as it should. Moreover, the priority document, Japanese application 2003-389891 filed on November 19, 2003 provides support for the present amendment. Copies of selected pages from the Japanese application are attached. It is, therefore, believed that no new matter has been added.

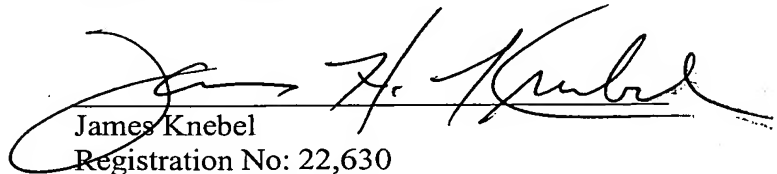
An action on the merits and allowance of the claims is earnestly solicited.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.  
Norman F. Oblon

Customer Number  
**22850**

Tel: (703) 413-3000  
Fax: (703) 413 -2220  
(OSMMN 03/06)

  
James Knebel  
Registration No: 22,630

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017195

International filing date: 18 November 2004 (18.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-389891  
Filing date: 19 November 2003 (19.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

29.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 1 月 1 9 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 8 9 8 9 1  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 3 8 9 8 9 1 ]

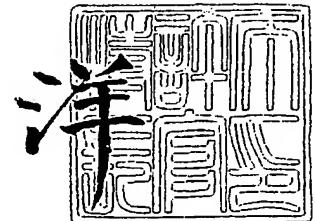
出 願 人            第一化学薬品株式会社  
Applicant(s):



2 0 0 5 年   1 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【表 1】

反応液のpH	実施例 1				比較例 1	
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
測定値の比 : fK/fV (%)	0.8	2.1	5.7	12.8	23.8	32.3
fK/fV (pH8.0) に対する割合 (%)	2.5	6.5	17.6	39.6	73.7	100.0
測定値の比 : fK/fVH (%)	1.0	2.5	6.8	14.9	27.5	42.2
fK/fVH (pH8.0) に対する割合 (%)	2.4	5.9	16.1	35.3	65.2	100.0

## 【0036】

表 1 から明らかなように、fK/fV、fK/fVHのいずれの場合でも、実施例の測定値の比は比較例と比べて、大幅に低値であった。本発明の方法は、fV、fVHに対する特異性が高く、フルクトシルリジン類との反応性は低いことがわかった。

## 【0037】

[実施例 2] フルクトシルアミノ酸の測定

## (1) 試料の調製

実施例 1 と同様、フルクトシルバリルヒスチジン (fVH) (バイオクエスト社製)、ε-フルクトシルリジン (fK) (キッコーマン社製) を0.02mol/Lのリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶かして0.3mmol/L濃度の試料とした。

## 【0038】

## (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用いて、以下の操作により各試料の測定を行った。

## &lt;第一試薬&gt;

実施例 1 の第一試薬を使用した。

## &lt;第二試薬&gt;

5単位/mL フルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX-CE) を5単位/mL フルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX-EE) に代える以外は実施例 1 と同組成の第二試薬を使用した。

(第一試薬と第二試薬は同一のpHの組み合わせで使用した。)

## 【0039】

実施例 1 と同一の操作を行った。結果を表 2 に示した。

## 【0040】

## 【表 2】

反応液のpH	実施例 2				比較例 2	
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
fK/fVH (%)	0.0	0.5	3.2	2.3	10.3	19.5
fK/fVH (pH8.0) に対する割合 (%)	0.0	2.6	16.4	11.8	52.8	100.0

## 【0041】

表 2 から明らかなように、実施例 1 とは異なるフルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX-EE) を用いた場合においても、比較例と比べて、fK/fVHが大幅に減少しており、フルクトシルバリルヒスチジンに対する特異性が高く、フルクトシルリジン類との反応性が低

いことがわかった。

#### 【0042】

【実施例3】 フルクトシルアミノ酸及びフルクトシルペプチドの測定

##### (1) 試料の調製

フルクトシルバリン、フルクトシルバリルヒスチジン（以上、バイオクエスト社製）、 $\epsilon$ -フルクトシルリジン（キッコーマン社製）をそれぞれ量り、0.02mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)に溶かして0.6mmol/L濃度の溶液とした。0.6mmol/Lフルクトシルバリン溶液及び0.6mmol/Lフルクトシルバリルヒスチジン溶液に等量の0.02mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)あるいは0.6mmol/L $\epsilon$ -フルクトシルリジン溶液を混合して、0.3mmol/Lフルクトシルバリン試料、0.3mmol/Lフルクトシルバリルヒスチジン試料、あるいは $\epsilon$ -フルクトシルリジンとの混合試料（各基質の濃度は0.3mmol/L）とした。

#### 【0043】

##### (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用いて、以下の操作により各試料の測定を行った。

##### <第一試薬>

実施例1の第一試薬のうち、pH5.5とpH6.5のもの、及び比較例1のうちpH8.0のものを使用した。

##### <第二試薬>

実施例1の第二試薬のうち、pH5.5とpH6.5のもの、及び比較例1のうちpH8.0のものを使用した。

（第一試薬と第二試薬は共通のpHの組み合わせで使用した。）

#### 【0044】

実施例1と同様に操作を行い、フルクトシルバリン試料の測定値に対するフルクトシルバリンと $\epsilon$ -フルクトシルリジンとの混合試料の測定値の比 $((fV+fK)/fV)$ 、及びフルクトシルバリルヒスチジン試料の測定値に対するフルクトシルバリルヒスチジンと $\epsilon$ -フルクトシルリジンとの混合試料の測定値の比 $((fVH+fK)/fVH)$ を算出し評価した。結果を表3に示す。

#### 【0045】

【表3】

反応液のpH	実施例3		比較例3
	5.5	6.5	8.0
$(fV+fK)/fV(\%)$	101.6	106.2	138.0
$(fVH+fK)/fVH(\%)$	101.7	108.8	141.6

#### 【0046】

表3から明らかなように、実施例3では、比較例3と比べて $\epsilon$ -フルクトシルリジンの影響が大きく軽減できていることがわかった。

#### 【0047】

【実施例4】 ヘモグロビンA1c (HbA1c) %の測定

##### (1) 試料の調製

EDTAを抗凝固剤として含む採血管を用いて被検者15人から常法により採血した全血を、冷室に一晩静置して赤血球を沈降させた。沈降した赤血球層より10 $\mu$ Lを採取し、これに、0.1%トリトンX-100水溶液 300 $\mu$ Lを加え混合し、血球溶血液試料を調製した。

#### 【0048】

##### (2) 試料の測定

日立7150形自動分析装置を用いて、以下の操作により各試料の測定を行った。

##### <第一試薬>

1単位/mL プロテイナーゼK